

MycAssay™ Aspergillus
Roche LightCycler® 2.0
Respiratorische Proben
REF 080-045

Vorgesehener Verwendungszweck

MycAssay™ Aspergillus ist vorgesehen für die Verwendung durch qualifiziertes Laborfachpersonal zum qualitativen Nachweis genomischer DNA von *Aspergillus* spp., die aus Patientenproben des unteren Respirationstrakts (z. B. Bronchialaspiratproben) zur Abklärung der Diagnose bei erwachsenen Patienten, bei denen eine durch *Aspergillus* verursachte Infektion oder Allergie vermutet wird, gewonnen wurde.

MycAssay™ Aspergillus wurde für die Verwendung mit dem Roche LightCycler® 2.0 validiert.

Informationen zum Test

Aspergillus spp. sind allgegenwärtige, opportunistische Fadenpilze, die sowohl allergische als auch invasive Erkrankungen (Syndrome) auslösen. Die Gattung umfasst annähernd 300 Spezies, von denen 41 mit menschlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht worden sind. Die überwiegende Anzahl der Infektionen wird durch *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* und *A. niger* verursacht; seltener sind *A. nidulans* und andere seltene Spezies wie *A. sydowii*, *A. versicolor*, *A. lentulus* und *A. pseudofischeri* am Infektionsgeschehen beteiligt.¹ Die meisten Infektionen und Allergien, die durch *Aspergillus* spp. verursacht werden, betreffen den Respirationstrakt. Zu den allergischen Syndromen gehören die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) und die allergische *Aspergillus*-Sinusitis, die in der Regel von *A. fumigatus* verursacht werden. Die chronische pulmonale Aspergillose umfasst das Aspergillom sowie die chronische kavernöse pulmonale Aspergillose und die chronische fibrosierende Aspergillose. Die invasive Aspergillose (IA) kommt in Risikopatientengruppen vor, einschließlich derjenigen, die mit Kortikosteroiden behandelt werden und solchen mit Neutropenie oder einer Phagozytendysfunktion (d. h. einer septischen Granulomatose und mit HIV-Infektion). Bei ungefähr 80 % aller Fälle von invasiver Aspergillose sind die Lungen betroffen.²

Zur Routinediagnostik bei invasiver pulmonaler Aspergillose gehören eine Computertomografie (CT), die Bronchoskopie und bronchoalveoläre Lavage (Mikroskopie und Kultur), der Test auf *Aspergillus*-Antigen im Blut oder die histologische Untersuchung von chirurgischen Biopsieproben. Dabei treten bei der Auswertung der Kulturen häufig falsch-negative Befunde auf.³ Tatsächlich ist die bronchoalveoläre Lavage nur bei etwa 40 % der Fälle positiv, selbst wenn die Diagnose durch andere Verfahren abgesichert ist.^{4,5,6,7} Dies zeigt die geringe Empfindlichkeit der Kulturmethode beim Nachweis der invasiven Aspergillose und der chronischen pulmonalen Aspergillose. Bei positivem Befund sind Kulturen allerdings ein wichtiger Hinweis, weil mit vielen diagnostischen Tests zum einen weder die Pilzgattung noch die -spezies, welche die Krankheit auslöst, identifiziert werden kann und zum anderen kein Hinweis auf das Empfindlichkeitsprofil gegenüber dem infektionsauslösenden Isolat erhalten wird.

Die allergische bronchopulmonale Aspergillose führt zu Komplikationen bei Asthma und zystischer Fibrose⁸ und tritt selten ohne eine zugrundeliegende Erkrankung auf. Die meisten Fälle stehen mit *A. fumigatus* in Zusammenhang, wobei andere Pilze damit gelegentlich in Verbindung gebracht werden. Die charakteristischen Merkmale dieser Erkrankung sind eine episodische Atemwegsobstruktion mit dicken Sputumpfropfen, die reich an *Aspergillus*-Hyphen sind, Serumwerte des Gesamt-IgE von > 1.000 IU/mL und nachweisbare, spezifische IgE- und IgG-Antikörper gegen *A. fumigatus* oder ein positiver Haut-Prick-Test auf *Aspergillus*. Die Sputumkulturen können für *A. fumigatus* positiv ausfallen und die Bronchiektasie kann auf einem CT-Scan der Brust erkannt werden.

¹ Spezies-Datenbank unter www.aspergillus.org.uk

² Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. (2005). The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp. Medical Mycology: 43 (Suppl 1): S207–38.

³ Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. (2005). Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet Infectious Diseases: 9: 609–22.

⁴ Levy H, Horak DA, Tegtmeier BR, Yokota SB, Forman SJ. (1992). The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Respir Med: 86: 243–8.

⁵ Greub G and Bille J. (1998) *Aspergillus* species isolated from clinical specimens: suggested clinical and microbiological criteria to determine significance. Clin Microbiol Infect 4: 710–716.

⁶ Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L, Chapman SW, Morrison VA, Pappas P, Hiemenz JW, Stevens DA, and the Mycoses Study Group. (2001). The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: A hospital-based survey of Aspergillosis. Clinical Infectious Diseases; 33:1824–33.

⁷ Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M. (2002). Use of Circulating Galactomannan Screening for Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients The Journal of Infectious Diseases. 186:1297–306.

⁸ Tillie-Leblond I, Tonnel AB. (2005). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Allergy: 60: 1004–13.

Die gegenwärtigen Methoden zur Diagnose der chronischen pulmonalen Aspergillose bestehen aus einer Kombination aus Radiologie (die unspezifisch ist)⁹ und Serologie (*Aspergillus*-IgG-Antikörper oder präzipitierende Antikörper), die bei den meisten Formen der Aspergillose positiv ist (und dementsprechend nicht spezifisch für eine bestimmte Erscheinungsform der Aspergillose).¹ Die Kulturen führen nur in 40–65 % der Fälle, in denen die Diagnose durch Radiologie und Serologie bestätigt wurde, zu einem positiven Befund.¹⁰¹¹ Da die Differenzialdiagnose sehr umfassend ist und Tuberkulose, atypische Mykobakteriose, Sarkoidose, Histoplasmose, Kokzidioidomykose, Pneumokoniose, rheumatoide Lunge, Spondylitis ankylosans (Morbus Bechterew) und andere Erkrankungen einschließt, ist das Dokumentieren der Anwesenheit von *Aspergillus* spp. in den Proben des Respirationstrakts sehr wichtig, um Verzögerungen bei der Diagnose der pulmonalen Aspergillose und eine Fehlbehandlung zu vermeiden.

MycAssay™ *Aspergillus* ist ein molekulardiagnostischer Kit für den Nachweis genomischer DNA von *Aspergillus* spp. mithilfe der Molecular-Beacon-Real-Time-PCR-Technologie.¹² Der gesamte Test kann – inklusive der DNA-Extraktion aus der klinischen Probe – innerhalb von 4 Stunden durchgeführt werden. Im Vergleich dazu werden für Pilzkulturen mehrere Tage benötigt, um einen positiven Befund zu erhalten. Dieser Assay bietet Vorteile gegenüber den gegenwärtig verfügbaren diagnostischen Verfahren für die akut invasive und die chronisch-pulmonale Aspergillose. Diese Vorteile umfassen einen schnelleren Nachweis von *Aspergillus* spp. und das Potential einer gesteigerten Empfindlichkeit für *Aspergillus* spp. in stark abwehrgeschwächten Patienten, die im Verdacht stehen, eine invasive pulmonale Aspergillose zu haben.

Testprinzip

Nach dem Mischen der Reagenzien des MycAssay™ *Aspergillus*-Kits mit einer Probe, die die *Aspergillus*-DNA-Zielsequenz (ein Abschnitt des ribosomalen 18S-Gens von *Aspergillus*) enthält, erfolgt die DNA-Amplifikation im Thermocycler. Der Assay enthält außerdem eine interne Amplifikations-Kontrolle (IAC) – ein DNA-Fragment, das weder in *Aspergillus* spp. noch in anderen Pilz- oder Bakteriengenomen und auch nicht im menschlichen Genom vorkommt –, um inhibitorische Substanzen im PCR-Ansatz nachzuweisen und die Funktionalität der Assay-Reagenzien zu bestätigen.

Die amplifizierten DNA-Zielsequenzen werden mithilfe der Molecular-Beacon-Technologie nachgewiesen. Molecular Beacons sind einzelsträngige Oligonukleotid-Hybridisierungs sonden, die eine Stamm-Schleifen-Struktur (engl. stem-and-loop structure) bilden. Die Schleife enthält eine zu einer Zielsequenz komplementäre Sondensequenz und der Stamm (Sequenzstrang) wird durch die Anlagerung der komplementären Armsequenzen gebildet, die an jeder Seite der Sondensequenz lokalisiert sind. Das Ende des einen Arms ist kovalent mit einem Fluorophor, der bei Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge fluoresziert, verbunden, während das Ende des anderen Arms – ebenfalls über eine kovalente Bindung – ein Quencher-Molekül trägt, das die Fluoreszenz des Fluorophors unterdrückt, solange es sich in unmittelbarer Nähe befindet. Die Molecular Beacons fluoreszieren nicht, wenn sie frei in der Lösung vorliegen. Wenn sie jedoch mit einem Nukleinsäurestrang hybridisieren, der eine Zielsequenz enthält, erfolgt eine Konformationsänderung, durch die Fluorophor und Quencher voneinander getrennt werden, sodass es nach Anregung zur Fluoreszenz kommt. Der Umfang der Fluoreszenz, d. h. die Intensität des Signals, in irgendeinem bestimmten Zyklus, oder nach der Beendigung der Zyklen, hängt von der Menge der spezifischen Amplicons ab, die zu diesem Zeitpunkt vorhanden sind. Das Real-Time-PCR-System detektiert in Echtzeit die von jedem Beacon emittierte Fluoreszenz.

Vorsichtsmaßnahmen

- Dieser Kit darf nur von Laborfachpersonal verwendet werden. Es werden Testverfahren für die aerosolfreie Handhabung der Proben benötigt. Die Standard-Vorsichtsmaßnahmen und die Labor-Richtlinien sollten bei der Bearbeitung sämtlicher Proben beachtet werden. Ein Material-Sicherheitsdatenblatt kann von Myconostica Ltd. bezogen werden.
- Dieser Test ist nur für den *in-vitro*-diagnostischen Gebrauch vorgesehen.
- Dieser Test bezieht sich ausschließlich auf die Verwendung mit dem Roche LightCycler® 2.0 und der LightCycler® v4.1 Software.
- Verwenden Sie keine Reagenzien oder Kontrollen, deren Schutzbeutel bei der Lieferung geöffnet oder beschädigt sind.
- Reagenzien und Kontrollen können nicht zwischen Kits mit unterschiedlichen Chargennummern ausgetauscht werden.
- Niemals Reagenzien oder Kontrollen aus unterschiedlichen Röhrchen vereinigen, selbst wenn sie aus derselben Charge stammen.

⁹ Greene R. (2005). The radiological spectrum of pulmonary aspergillosis. *Med Mycol*: 43 (Suppl 1): S147–154.

¹⁰ Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. (2003). Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: Case series, proposed nomenclature and review. *Clin Infect Dis*: 37 (Suppl 3): S265–280.

¹¹ Camuset J, Lavalé A, Wislez M, Khalil A, Bellocq A, Bazelly B, Mayaud C, Cadranel J. (2007). Bronchopulmonary aspergillosis infections in the non-immunocompromised patient. *Rev Pneumol Clin*. 63:155-166

- Verwenden Sie Reagenzien oder Kontrollen niemals nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Nach dem Öffnen sollten die Reagenzien und Kontrollen nicht wieder eingefroren oder wiederverwendet werden.
- Beim Umgang mit den Reagenzien des Kits sind Schutzkleidung und Einmal-Handschuhe zu tragen.
- Mikrobielle Kontamination oder Kontamination der Reagenzien durch Desoxyribonuklease (DNase) während der Entnahme von Aliquoten vermeiden.
- Die Verwendung von sterilen, DNase-freien Low-Retention-Einmal-Filterpipettenspitzen oder Pipettenspitzen für Positive-Displacement-Pipetten wird empfohlen.
- Benutzen Sie für jede Probe und jedes Reagenz eine neue Pipettenspitze.
- Entsorgen Sie ungebrauchte Reagenzien und Abfälle gemäß den geltenden Bundes-, Landes- oder örtlichen Vorschriften.
- Zur Vermeidung von Kontaminationen mit *Aspergillus*- oder IAC-Amplicons sollten die Reaktionsgefäße nach der Amplifikation nicht mehr geöffnet werden.
- Das Testen zusätzlicher Kontrollen kann gemäß den Richtlinien oder Bestimmungen von örtlichen, Landes- und/oder Bundesbehörden oder akkreditierenden Organisationen erforderlich sein.
- In Arbeitsbereichen, in denen mit Proben oder Kit-Reagenzien gearbeitet wird, darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden.
- Lösungen mit einer niedrigen DNA-Konzentration können bei unsachgemäßer Lagerung instabil sein. Es wird empfohlen, die aus klinischen Proben extrahierte DNA bei -80 °C zu lagern, um die DNA-Integrität zu erhalten. Wenn möglich, sollte wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren vermieden werden.

Kit-Inhalt

Beschreibung

Der Kit enthält fünf Folienbeutel mit jeweils drei verschlossenen Kompartimenten; die Beutel können einzeln aus der Schachtel entnommen und separat verwendet werden. Jeder Beutel enthält genug Reagenzien für acht Reaktionen.

		<u>Volumen</u>
Röhrchen 1 (oranger Deckel)	dNTPs MgCl ₂ Gepufferte Lösung mit DNA-Polymerasekomplex	66 µL
Röhrchen 2 (grüner Deckel)	< 0,01 % Primer < 0,01 % Molecular Beacons < 0,0001 % interne Amplifikationskontrolle (IAC) Die interne Amplifikationskontrolle ist ein rekombinantes DNA-Plasmid, das eine nicht-infektiöse Sequenz enthält, die mit keiner <i>Aspergillus</i> -Zielsequenz übereinstimmt. Tris-HCl Puffer	66 µL
Röhrchen 3 (farbloser Deckel)	Negativkontrolle Wasser	25 µL
Röhrchen 4 (schwarzer Deckel)	Positivkontrolle < 0,0001 % Positivkontroll-DNA Die Positivkontroll-DNA ist ein rekombinantes Plasmid, das die <i>Aspergillus</i> -Zielsequenz enthält. Tris-HCl Puffer	25 µL

Der Kit enthält außerdem:

- Myconostica Protokoll-CD-ROM für den MycAssay™ *Aspergillus*-Test
- Gebrauchsanweisung
- Analysenzertifikat

¹² Tyagi S, Kramer FR. (1996). Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnology: 14: 303-308.

Aufbewahrung

Der Kit sollte bis zum Verfallsdatum, das auf dem Etikett der Schachtel angegeben ist, eingefroren (-15 bis -25 °C) gelagert werden. Danach sollte er gemäß den örtlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Nach Öffnen eines Beutels muss dessen Inhalt sofort verwendet werden; die Reagenzien dürfen nicht erneut eingefroren oder wiederverwendet werden.

Vom Anwender bereitzustellende Geräte und Materialien

- Real-Time-PCR-System des Roche LightCycler® 2.0 (inklusive Benutzerhandbuch, angeschlossenen Computers und LightCycler® Software v4.1)
- LC 2.0 Karussellzentrifuge (optional Kapillaradapter für Minizentrifuge)
- Probenkarussell für 20-µl-Kapillaren
- LC 2.0 20-µl-Kapillaren mit Deckel
- Kapillarrack-Halter
- Kapillar-Releaser
- Verschlusswerkzeug
- Mikrozentrifuge
- Laborschüttler (Vortex)
- Mikroliter-Pipetten (Volumenbereich: 7,5–20 µL)
- Sterile Low-Retention-Filter-Pipettenspitzen
- Einmal-Handschuhe, puderfrei
- Anwendereigene DNA-Dekontaminationslösung
- DNA-Extraktions-Kit (siehe unten)
- MycAssay™ CC-Kit (siehe unten)

Probe

Als Ausgangsprobe für den MycAssay™ Aspergillus-Assay wird genomische Gesamt-DNA verwendet, die aus klinischen BAL-Proben oder anderen Proben der unteren Atemwege extrahiert wurde. Für diesen Zweck werden der im Folgenden genannte DNA-Extraktions-Kit sowie die Ausrüstung empfohlen, die bei der Validierung verwendet wurden:

- MycXtra™ Pilz-DNA Extraktions-Kit (REF-Nr.: 080-005, bei Myconostica erhältlich)
- Laborschüttler Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., New York, USA)
- Adapterplatte für Vortex-Laborschüttler (REF-Nr.: 080-015, bei Myconostica erhältlich)

MycAssay Farbabgleichskit (“Colour Compensation”, CC)

Für die genaue Auswertung von Daten, die mithilfe des MycAssay™ Aspergillus-Assays gewonnen wurden, ist eine Farbabgleichsdatei anzuwenden, die mit Hilfe des Myconostica MycAssay CC-Kits [Ref.-Nr. 080-080] angelegt wurde. Nach dem Erstellen kann diese Datei für mehrere Läufe auf demselben Gerät verwendet werden. Bitte wenden Sie sich wegen weiterer Einzelheiten an Ihren örtlichen Vertriebspartner.

Hinweise zur Durchführung

Lesen Sie das gesamte Protokoll, bevor Sie mit der Durchführung beginnen.

- Die Durchführung des MycAssay™ Aspergillus-Tests dauert (ohne DNA-Extraktion) ungefähr zwei Stunden, je nach Anzahl der zu analysierenden Proben.
- Das Ansetzen der Reaktionen für den Test sollte in einer PCR-Workstation oder in einem Labor, das räumlich vom PCR-Labor getrennt ist, durchgeführt werden. Falls eine PCR-Workstation nicht zur Verfügung steht, sollte das Ansetzen der Reaktionen in einem für PCR geeigneten Bereich des Labors¹³, der räumlich getrennt ist von den Bereichen, die für DNA-Extraktionen genutzt werden, und der regelmäßig mit DNA-Dekontaminations-Reagenzien gereinigt wird, erfolgen.
- Während des Ansetzens der Real-Time-PCR-Reaktionen sollten Sie allerdings keine DNA-Dekontaminationslösungen verwenden, da dies die Reaktionen inhibieren könnte.
- Verwenden Sie Mikroliter-Pipetten für den Transfer von Flüssigkeiten. Für das Ansetzen der Reaktionen sollten separate Mikroliter-Pipetten verwendet werden, die regelmäßig dekontaminiert werden sollten.

¹³ Siehe beispielsweise Mifflin, T. E. (2003). Setting up a PCR Laboratory. In PCR Primer, 2nd Ed. (eds. Dieffenbach and Dveksler). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. USA.

- Es wird empfohlen, Low-Retention-Filter-Pipettenspitzen zu verwenden, um sicherzustellen, dass während des PCR-Setup keine DNA durch Anhaftungen verloren geht.
- **Mit Röhrchen Nr. 4 sollten Sie besonders vorsichtig umgehen. Es enthält Positivkontroll-DNA-Material und eine Kontamination könnte falsch-positive Testergebnisse verursachen.**
- Tragen Sie während der gesamten Prozedur Einmal-Laborhandschuhe.
- Alle Reagenzienröhrchen müssen nach Gebrauch und vor der Entsorgung mit dem zugehörigen Deckel verschlossen werden.
- Notieren Sie auf dem Versuchsplan sorgfältig die Positionen aller Kapillaren, die relevante Proben enthalten, in den 32 Positionen des Karussells.
- Für die genaue Auswertung der Daten ist eine Farbabgleichsdatei anzuwenden, die mithilfe des Myconostica MycAssay CC-Kits angelegt wurde.

Testdurchführung

1. Ansetzen der Real-Time-PCR

- 1.1 Schalten Sie das LightCycler® 2.0 Real-Time-PCR-System (Gerät, zugehörigen Computer und Zentrifuge) ein und starten Sie die zugehörige Software. Geben Sie Benutzernamen und Passwort ein, wenn Sie dazu aufgefordert werden, und wählen Sie die Datenbank „Diagnostic“ aus. Wenn es sich um den ersten Lauf eines Tages handelt, führen Sie zunächst einen Selbsttest des Geräts durch, bevor Sie einen Lauf vorbereiten.
- 1.2 **Achtung:** Vor der Auswertung von Ergebnissen, die mit MycAssay™ Aspergillus auf dem LightCycler® 2.0 gemessen wurden, muss der Farbabgleichslauf abgeschlossen sein. Dieser Lauf muss jedoch nicht vor der Verwendung dieses Assays durchgeführt werden, sondern kann auch später erfolgen und auf die Laufdateien angewendet werden.
- 1.3 Stellen Sie sicher, dass der Arbeitsbereich mit DNA-Dekontaminationslösung gereinigt und vollständig trocken ist; vermeiden Sie während des Ansetzens der Reaktionen die Verwendung dieser Lösung, da sie die PCR-Reaktionen inhibieren könnte.
- 1.4 Ein Beutel enthält jeweils eines der Röhrchen 1, 2, 3 und 4. Die Reagenzien in einem Beutel reichen für die Durchführung von acht Reaktionen. Mindestens eine Positivkontroll-Reaktion und eine Negativkontroll-Reaktion müssen pro Lauf mit durchgeführt werden, wobei die Reagenzien aus einer einzigen Kit-Charge stammen müssen. Daher können 6 Patientenproben mit einer Packung analysiert werden. Falls mehr als sechs Proben untersucht werden müssen, können mehrere Beutel verwendet werden, wobei die verwendeten Beutel aus derselben Kit-Charge stammen müssen. Der LightCycler® 2.0 kann jedoch nur bis zu 32 Proben in einem Lauf aufnehmen. Es können daher maximal 30 Patientenproben in einem Lauf bearbeitet werden (4 Beutel).
- 1.5 Berechnen Sie unter Berücksichtigung der folgenden Tabelle die Anzahl der benötigten Reaktionsansätze:

Anzahl Beutel	Maximale Anzahl an Patientenproben
1	6
2	14
3	22
4	30

- 1.6 Nehmen Sie die entsprechende Anzahl der Beutel aus dem Tiefkühlschrank. Einen Beutel, der nicht mehr dicht verschlossen ist, sollten Sie nicht verwenden. Falls die aus den Patientenproben gewonnenen DNA-Proben nach der Extraktion eingefroren wurden, entnehmen Sie auch sie aus dem Tiefkühlschrank.
- 1.7 Öffnen Sie die benötigte Anzahl an Beuteln und entnehmen Sie die Röhrchen. Wenn insgesamt mehrere Reagenzienbeutel für eine Analyse benötigt werden, aber nur ein Satz Positiv- und Negativkontrollen, dann brauchen Sie die Röhrchen 3 und 4 nur aus einem der Beutel zu entnehmen. **Mit Röhrchen Nr. 4 sollten Sie besonders vorsichtig umgehen. Es enthält Positivkontroll-DNA-Material und eine Kontamination könnte falsch-positive Patientenergebnisse verursachen.**
- 1.8 Lassen Sie die Röhrchen für 5–10 Minuten bei Raumtemperatur auftauen; vergewissern Sie sich, dass der Inhalt jedes Röhrchens vollständig aufgetaut ist, bevor Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren. Mischen Sie den Inhalt der Röhrchen und die Patientenproben kurz auf einem Laborschüttler (Vortex). Zentrifugieren Sie anschließend kurz in einer Mikrozentrifuge, um den gesamten Inhalt vor Gebrauch vollständig am Boden der Röhrchen zu sammeln.
- 1.9 Platzieren Sie die erforderliche Anzahl an 20-µl-Kapillaren in einem Kapillarrack-Halter. Achten Sie darauf, keine Abdrücke auf dem Glas zu hinterlassen.

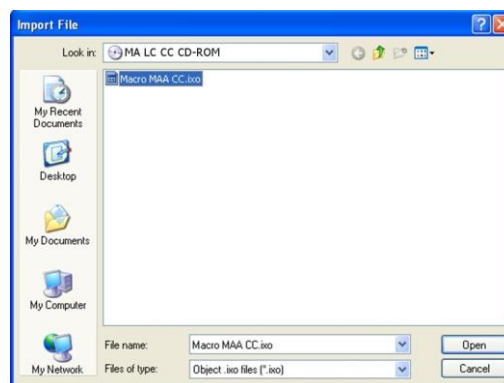
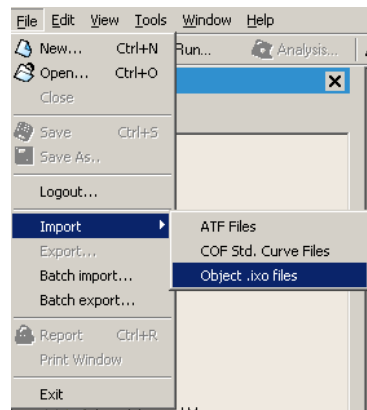
- 1.10 Pipettieren Sie die Negativkontrolle immer zuerst, danach die Patientenproben. Als Letztes sollte immer die Positivkontrolle hinzugegeben werden.
- 1.11 Die zu pipettierenden Volumina der Reagenzien und DNA-Lösungen bzw. Proben sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Reagenz	Reaktion		
	Negativkontrolle	Patientenproben	Positivkontrolle
Röhrchen 1 (oranger Deckel)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Röhrchen 2 (grüner Deckel)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Röhrchen 3 (farbloser Deckel)	10 µL	-	-
Patientenproben	-	10 µL	-
Röhrchen 4 (schwarzer Deckel)	-	-	10 µL
Gesamtvolumen	25 µL	25 µL	25 µL

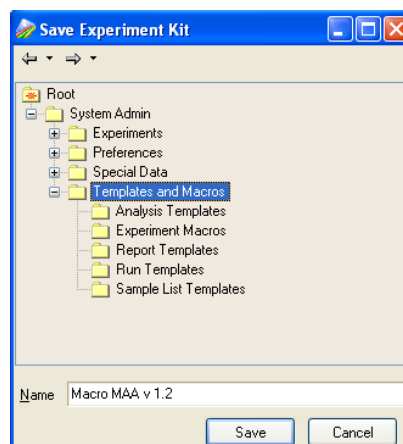
- 1.12 Pipettieren Sie die Reagenzien in derselben Reihenfolge, wie sie in obiger Tabelle aufgelistet sind: Röhrchen 1, dann Röhrchen 2, anschließend die Template-DNA (Negativkontrolle, Patientenprobe oder Positivkontrolle). Entnehmen Sie die Aliquote aus Röhrchen 1 vorsichtig; die Flüssigkeit ist etwas viskos und kann eventuell an der inneren Kante des Röhrchens anhaften. Falls dies geschieht, zentrifugieren Sie nochmals kurz, um den Inhalt vollständig am Boden des Röhrchens zu sammeln, bevor Sie erneut versuchen, das gesamte Aliquot zu entnehmen.
- 1.13 Benutzen Sie für jeden Pipettiervorgang eine neue Pipettenspitze. Verschließen Sie nach Gebrauch jedes Röhrchen wieder und entsorgen Sie es – mitsamt dem eventuell verbliebenen restlichen Inhalt – unverzüglich in einen verschließbaren Behälter für klinische Abfälle. Nicht gebrauchte Reagenzien können nicht für spätere Verwendung aufbewahrt werden.
- 1.14 Seien Sie beim Pipettieren der Positivkontroll-DNA (Röhrchen 4) besonders vorsichtig und stellen Sie sicher, dass keine der anderen Reaktionen damit kontaminiert wird. Durch das Verschließen aller anderer Kapillaren vor dem Öffnen von Röhrchen 4 kann das Risiko der Kreuzkontamination vermindert werden.
- 1.15 Verschließen Sie die Kapillaren behutsam mit den in der Kapillarenbox bereitgestellten Deckeln. Verwenden Sie hierzu ein Verschlusswerkzeug. Vergewissern Sie sich, dass die Kapillaren fest verschlossen sind. Die Kapillaren können verschlossen werden, sobald die Template-DNA zur Reaktion hinzugefügt wurde, wenn die Möglichkeit einer Kreuzkontamination bzw. Kontamination durch Substanzen aus der Umwelt reduziert werden soll.
- 1.16 Steht die Karussellzentrifuge nicht zur Verfügung, zentrifugieren Sie die Proben mithilfe der Adapter, die den Rackhaltern beiliegen, in einer Mikrozentrifuge. Ansonsten fahren Sie mit Schritt 1.17 fort.
- 1.17 Überführen Sie mit großer Sorgfalt alle Kapillaren in das Karussell. Achten Sie darauf, dass sie sich in exakt derselben Reihenfolge wie im Rackhalter befinden und beginnen Sie mit der ersten Kapillare in Position 1 und fahren Sie in aufsteigender Reihenfolge – ohne Lücken zu lassen – fort. Drücken Sie jede Kapillare ganz nach unten, bis sie fest eingerastet ist.
- 1.18 Wurden die Proben nicht in Schritt 1.16 zentrifugiert, zentrifugieren Sie diese nun mit der LC 2.0 Karussellzentrifuge
- 1.19 Fahren Sie unverzüglich mit Abschnitt 2 fort. Die angesetzten MycAssay™ Reaktionen zum Nachweis von Aspergillus sind für bis zu 60 Minuten stabil.
- 1.20 Stellen Sie sicher, dass der gesamte Arbeitsbereich im Anschluss an das PCR-Setup gründlich mit DNA-Dekontaminationslösung gereinigt wird.

2. Durchführung des Laufs

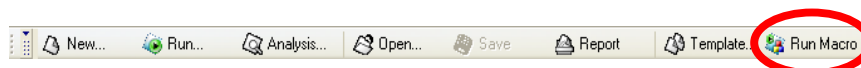
- 2.1 Legen Sie die **MycAssay Aspergillus Protokoll-CD-ROM** von **Myconostica** in das Laufwerk ein.
- 2.2 Wählen Sie im Menü **File** die Option **Import** und wählen Sie dann **Object .ixo files**. Importieren Sie die Datei **Macro MAA v1.2.ixo** von der CD in die Datenbank.



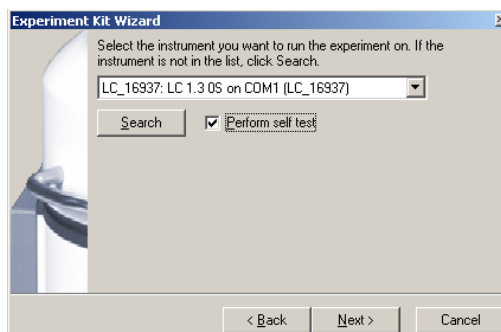
- 2.3 Wählen Sie im Menü **File** die Option **Save** und speichern Sie das Makro-Template am gewünschten Ort in der Datenbank.



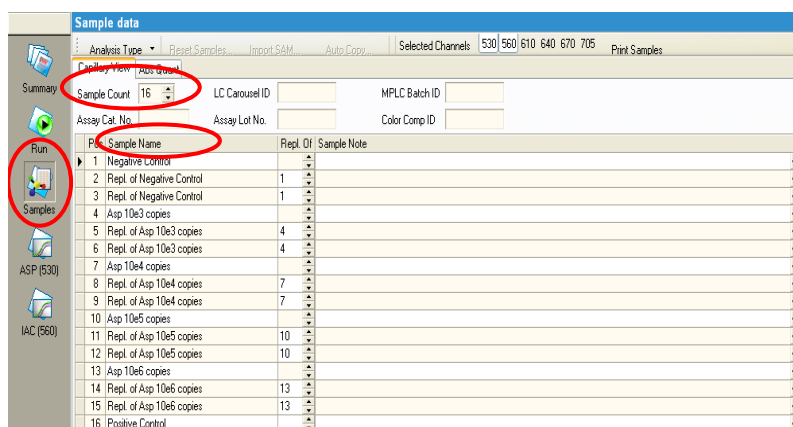
- 2.4 Wählen Sie in der Symbolleiste die Option **Run Macro**.



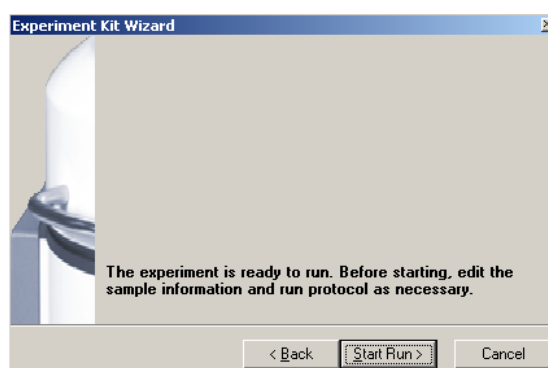
- 2.5 Wählen Sie die Template-Datei **Macro MAA v1.2** und drücken Sie **Open**.
- 2.6 Folgen Sie den Anweisungen des Installationsassistenten. Markieren Sie das Kästchen **Perform Self-Test**, wenn es sich um den ersten Lauf am Tag handelt.



- 2.7 Benennen Sie die Laufdatei und speichern diese am gewünschten Ort.
2.8 Rufen Sie durch Klicken auf die Registerkarte links im Bildschirm den Bereich **Samples** auf. Bearbeiten Sie auf der Registerkarte **Capillary View** die Anzahl (im Feld **Sample Count**) und Namen der Proben. Benennen Sie die Proben entsprechend dem Versuchsplan und den Positionen im Karussell.

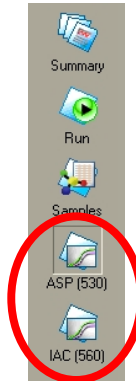


- 2.9 Setzen Sie das zentrifugierte Karussell in das LC 2.0 Gerät. Stellen Sie sicher, dass die Aussparung unter Probenposition 1 auf dem Karussell auf dem Stift in der Thermokammer einrastet. Vergewissern Sie sich, dass das Karussell fest in die Kammer eingesetzt ist, und schließen Sie den Deckel.
2.10 Wenn Sie damit fertig sind, drücken Sie die Taste **Start**. Vergewissern Sie sich, dass das Gerät alle Kapillaren im Karussell gefunden hat und dass das Programm gestartet wurde.

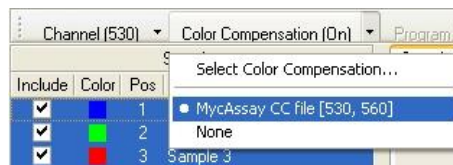


3. Auswertung der Daten und Interpretation der Ergebnisse

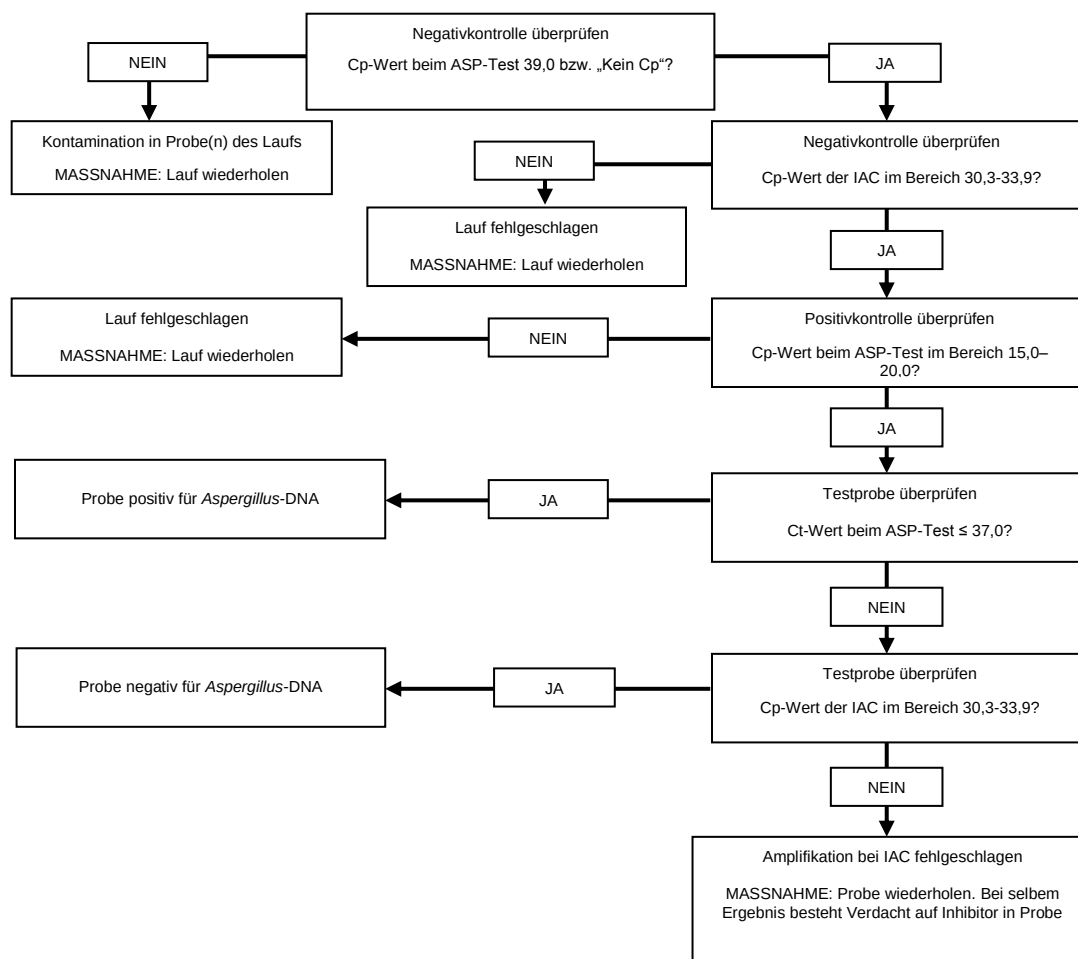
- 3.2 **Achtung:** Vor der Auswertung von Ergebnissen, die mit MycAssay™ Aspergillus auf dem LightCycler® 2.0 gemessen wurden, muss ein Farbabgleichsobjekt angewendet werden. Haben Sie ein solches noch nicht erstellt, tun Sie dies nun und fahren erst danach mit Auswertung und Interpretation der Daten fort.
Nach Abschluss des Laufs überprüfen Sie den Bericht im Popup-Fenster und drucken ihn bei Bedarf aus.
- 3.3 Die Aspergillus-Ergebnisse können im Analysebereich **Pathogen (530)** und die IAC-Ergebnisse im Bereich **IAC (560)** betrachtet werden.



- 3.4 Wählen Sie in den beiden Bereichen **ASP (530)** und **IAC (560)** die korrekte Farbabgleichsdatei (**MycAssay CC file**), die auf das Experiment angewendet werden soll.



- 3.5 Werten Sie – mit den Kontrollen beginnend – jede Probe wie im folgenden Flussdiagramm gezeigt aus (weitere Details können auch der Tabelle unter dem Flussdiagramm entnommen werden).



Probe	Pathogen (530) Cp	IAC (560) Cp	Interpretation	Weitere Maßnahme
Negativkontrolle	39,0 oder „Kein Cp“	Im Bereich 30,3-33,9	Negativkontrolle akzeptabel	Ergebnisse der Patientenproben sind valide
Negativkontrolle	39,0 oder „Kein Cp“	< 30,3 oder > 33,9	Negativkontrolle fehlgeschlagen	Gesamten Lauf wiederholen
Negativkontrolle	<39,0	Im Bereich 30,3-33,9	Kontamination	Gesamten Lauf wiederholen
Positivkontrolle	Im Bereich 15,0-20,0	–	Positivkontrolle akzeptabel	Ergebnisse der Patientenproben sind valide
Positivkontrolle	< 15,0 oder > 20,0	–	Positivkontrolle fehlgeschlagen	Gesamten Lauf wiederholen
Patientenprobe	≥39,0 oder „Kein Cp“	Im Bereich 30,3-33,9	Probe ist negativ für <i>Aspergillus</i>	Ergebnis speichern oder ausdrucken: Ergebnis 1
Patientenprobe	≤37,0	–	Probe ist positiv für <i>Aspergillus</i>	Ergebnis speichern oder ausdrucken: Ergebnis 2
Patientenprobe	39,0 oder „Kein Cp“	< 30,3 oder > 33,9	Amplifikation der IAC in der Probe fehlgeschlagen	Analyse der Probe wiederholen: Ergebnis 3

*CCO = klinischer Cut-off-Wert („clinical cut-off“). Alle Ergebnisse bei diesem oder kleineren Werten werden als klinisch positiv angesehen. Bei anderen Proben können Cp-Werte von > 37,0 gemessen werden. Solche Werte spiegeln den normalen oder Hintergrund-Wert der *Aspergillus*-Last in Proben wider, die aus dem Respirationstrakt gewonnen wurden.

Siehe den Abschnitt „Klinische Befundung“ (bei Ergebnis 1, 2 oder 3).

4. Hinweise zur Fehlersuche

4.1 Die Negativkontrolle ergab ein positives Signal im 530-Kanal:

- Beim Ansetzen kam es zu einer Kontamination. Die Ergebnisse des gesamten Analysenlaufs können nicht als zuverlässig angesehen werden.
- Wiederholen Sie den gesamten Lauf; gehen Sie dabei mit besonderer Sorgfalt vor, wenn Sie die Templates – vor allem die Positivkontrolle (Röhrchen 4) – zugeben, um sicherzustellen, dass es nicht zu einer Kreuzkontamination kommt.
- Vergewissern Sie sich, dass der Arbeitsbereich sowie Geräte und Hilfsmittel vor und nach Gebrauch auf korrekte Art und Weise dekontaminiert werden.
- Die Negativkontrolle befand sich nicht an der richtigen Position im Gerät.
- Achten Sie darauf, allen Kapillaren in der Software die korrekte Bezeichnung zuzuweisen.

4.2 Der Cp-Wert der IAC in der Negativkontrolle liegt außerhalb des akzeptablen Bereichs:

- Die PCR wurde inhibiert.
- Stellen Sie sicher, dass die Arbeitsfläche sowie Geräte und Hilfsmittel nach der Anwendung von Dekontaminationslösungen und vor dem PCR-Setup völlig trocken sind.
- Die Bedingungen, unter denen der Kit gelagert wurde, entsprachen nicht den Angaben im Abschnitt „Aufbewahrung“ dieser Gebrauchsanweisung oder das Verfallsdatum des Kits ist abgelaufen.
- Überprüfen Sie bitte, dass der Kit unter korrekten Bedingungen gelagert wurde. Überprüfen Sie das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Kit-Schachtel oder Etikett auf Reagenzienbeuteln) und wiederholen Sie den Lauf ggf. mit einem Kit, dessen Verfallsdatum noch nicht abgelaufen ist.
- Entweder wurde das Reagenz aus Röhrchen 1 oder 2 nicht zur PCR-Reaktion gegeben oder die doppelte Menge des Reagenzes aus Röhrchen 2 wurde pipettiert.
- Wiederholen Sie den Lauf; führen Sie dabei das Ansetzen der Reaktionen mit großer Sorgfalt durch. Derartige (Pipettier-)Fehler kann man an einem höheren oder niedrigeren Flüssigkeitsstand in einer der Reaktionskapillaren – im Vergleich zu den anderen Kapillaren – erkennen.
- Es wurde nicht die korrekte CC-Datei auf die Daten angewendet.
- Erstellen Sie mithilfe des Myconostica MycAssay CC-Kits eine CC-Datei, wenden Sie diese auf die Ergebnisse an und führen Sie die Auswertung erneut durch. Wenden Sie sich wegen weiterer Einzelheiten zu diesem Kit an Ihren örtlichen Vertriebspartner.

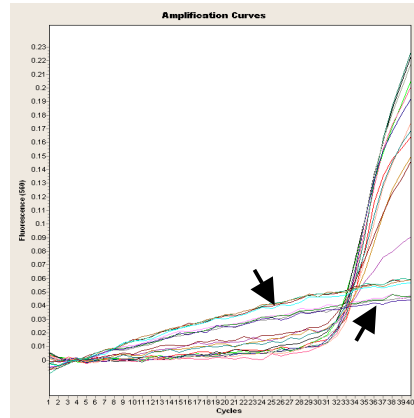
4.3 Die Positivkontrolle ergibt ein negatives Ergebnis:

- Die Bedingungen, unter denen der Kit gelagert wurde, entsprachen nicht den Angaben im Abschnitt „Aufbewahrung“ dieser Gebrauchsanweisung oder das Verfallsdatum des Kits ist abgelaufen.
- Überprüfen Sie bitte, dass der Kit unter korrekten Bedingungen gelagert wurde. Überprüfen Sie das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Kit-Schachtel oder Etikett auf Reagenzienbeuteln) und wiederholen Sie den Lauf ggf. mit einem Kit, dessen Verfallsdatum noch nicht abgelaufen ist.
- Es kam zu einem Fehler bei Schritt 1.11 bis 1.13 und die Template-DNA der Positivkontrolle (Röhrchen 4) wurde in das falsche Reaktionsgefäß pipettiert.
- Wiederholen Sie den Lauf; führen Sie dabei das Ansetzen der Reaktionen mit großer Sorgfalt durch. Derartige (Pipettier-)Fehler kann man an einem höheren Flüssigkeitsstand in einem Reaktionsgefäß und einem niedrigeren Flüssigkeitsstand in einem anderen Gefäß – im Vergleich zu den übrigen Gefäßen – erkennen.
- Das Reagenz aus Röhrchen 1 oder aus Röhrchen 2 wurde nicht zur Reaktion pipettiert.
- Wiederholen Sie den Lauf; führen Sie dabei das Ansetzen der Reaktionen mit großer Sorgfalt durch. Derartige (Pipettier-)Fehler kann man an einem niedrigeren Flüssigkeitsstand in diesem Reaktionsansatz – im Vergleich zu den anderen Kapillaren – erkennen.
- Die Positivkontrolle befand sich nicht an der richtigen Position im Gerät.
- Achten Sie darauf, allen Kapillaren in der Software die korrekte Bezeichnung zuzuweisen.

4.4 Patientenproben sind negativ und die IAC liegt außerhalb des akzeptablen Bereichs(Ergebnis 3):

- Wahrscheinlich enthalten die Patientenproben PCR-Inhibitoren.
- Wir empfehlen, die DNA aus den Proben mit dem MycXtra™ Pilz-DNA Extraktions-Kit (MycXtra™ Fungal DNA Extraction Kit) zu isolieren.

4.5 Die Patientenprobe ist negativ im Bereich „ASP (530)“ und die IAC (560)-Kurve hat sich deutlich von der regulären Grundlinie wegbewegt (siehe nachfolgende Beispielabbildung; Pfeile zeigen ungewöhnliche Kurven an):



- Die PCR-Reaktion wurde inhibiert.
- Stellen Sie sicher, dass die Arbeitsfläche sowie Geräte und Hilfsmittel nach der Anwendung von Dekontaminationslösungen und vor dem PCR-Setup völlig trocken sind.
- Führen Sie den Lauf der Patientenprobe nochmals durch. Tritt das Problem erneut auf, ist der PCR-Inhibitor in der Probe vorhanden. Geben Sie „Nicht bestimmt“ als Ergebnis für die Probe an.

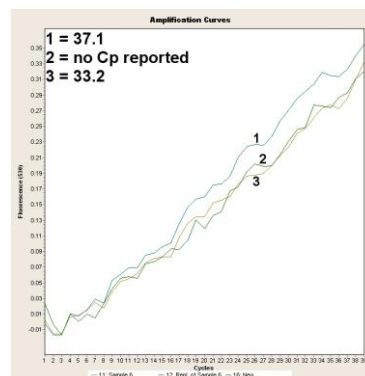
4.6 Die Ergebnisse im Bereich „IAC (560)“ stimmen nahezu exakt mit denen im Bereich „Pathogen (530)“ überein.

Es wurde keine oder eine falsche Farbabgleichsdatei (CC-Datei) auf die Versuchsergebnisse angewendet.

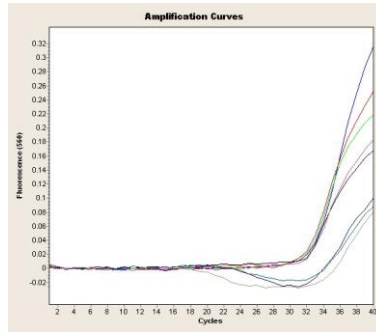
- Überprüfen Sie in beiden Analysebereichen, ob der Farbabgleich aktiviert ist und ob dieselbe MycAssay CC-Datei auf beide Kanäle angewendet wurde.

4.7 Die Grundlinie stimmt bei manchen Proben mit der Negativkontrolle überein, was auf eine nicht erfolgte Amplifikation hindeutet. Die Software hat jedoch einen positiven Cp-Wert ausgegeben (wie in der Abbildung unten):

- Die Ausgabe eines positiven Cp-Wertes für ein negatives Amplifikationsdiagramm wurde bei 154 negativen Reaktionen, die während der Validierungsstudien ausgeführt wurden, nur zweimal beobachtet.
- Geschieht dies, wiederholen Sie bitte die Probe(n), um das Ergebnis *Negativ* zu bestätigen.



4.8 Wenn ich mein CC-Objekt anwende, fallen einige der Daten im 560-IAC-Kanal ab, was zu Cp-Werten außerhalb des zulässigen Bereichs führt:



- Dies ist vollkommen normal bei Reaktionen, die hohe Konzentrationen der DNA-Zielsequenz enthalten, und stört nicht die Interpretation der Patientenergebnisse.
- Folgen Sie dem normalen Analyseablauf; Sie werden feststellen, dass bei Proben, die positiv auf Aspergillus sind, das IAC-Ergebnis nicht für eine Ergebnisentscheidung bezüglich des betreffenden Patienten erforderlich ist.

4.9 In keinem Kanal wird ein Ergebnis erhalten – weder bei einer Probe noch bei den Kontrollen:

- Die Bedingungen, unter denen der Kit gelagert wurde, entsprachen nicht den Angaben im Abschnitt „Aufbewahrung“ dieser Gebrauchsanweisung oder das Verfallsdatum des Kits ist abgelaufen.
- Überprüfen Sie bitte, dass der Kit unter korrekten Bedingungen gelagert wurde. Überprüfen Sie das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Kit-Schachtel oder Etikett auf Reagenzienbeuteln) und wiederholen Sie den Lauf ggf. mit einem Kit, dessen Verfallsdatum noch nicht abgelaufen ist.
- Das verwendete Gerät arbeitet nicht optimal.
- Überprüfen Sie bitte, dass Ihr Real-Time-PCR-Gerät über eine regelmäßig aktualisierte Wartungs-Historie verfügt und vollständig kalibriert wurde, so wie dies in der zugehörigen Installations- und Wartungsanleitung beschrieben ist.
- Beim Software-Setup wurde die falsche Protokolldatei verwendet.
- Beachten Sie die Angaben in Abschnitt 2 und wählen Sie von der Myconostica Protokoll-CD-ROM die korrekte Protokolldatei, die für die betreffende Software in der jeweiligen Version angegeben wird. Nur die Datei, die der installierten Software entspricht, kann geladen werden. Wiederholen Sie den Lauf mit der richtigen Protokolldatei.

Wenn Sie weitere Fragen haben oder Hilfe bei Problemen benötigen, setzen Sie sich bitte mit unserem Technischen Kundendienst (productsupport@lab21.com) in Verbindung.

Leistungsmerkmale und Anwendungsgrenzen

Dieser Kit wurde ursprünglich mit einem Cepheid Smartcycler® Real-Time-PCR-System validiert. Einige der angegebenen Leistungsmerkmale des Assays wurden mit der LightCycler® 2.0 Plattform unter Verwendung von 20-µL-Glaskapillaren (von Roche, Kat.-Nr. 04929292001 oder 11909339001) erneut validiert. Diese Untersuchungen sind im Folgenden wiedergegeben. Wo davon auszugehen war, dass die Unterschiede zwischen den Geräte-Plattformen keinen Einfluss auf die Assay-Performance und daher auch nicht auf die behaupteten Leistungsmerkmale haben, wurde die Untersuchung nicht wiederholt. In diesen Fällen wird davon ausgegangen, dass die mit dem SmartCycler® erhaltenen Ergebnisse auf die LightCycler® 2.0 Plattform übertragbar sind.

Analytische Sensitivität

Unter Verwendung des oben beschriebenen Protokolls für den LightCycler® 2.0 und der bei Myconostica hergestellten PCR-Templates wurde als Grenzwert der Leerprobe („Limit of Blank“, LoB) für den MycAssay™ Aspergillus-Test ein Cp-Wert von 39,0 bestimmt; die Nachweisgrenze („Limit of Detection“, LoD) lag bei < 25 Kopien der Target-DNA-Sequenz, wobei der Stamm AF293 von *A. fumigatus* verwendet wurde.

Analytische Selektivität

Genomische DNA, die aus *Penicillium* spp. extrahiert wurde, ergab positive Ergebnisse. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Sequenzen der molekularen Targets zwischen *Aspergillus* und *Penicillium* hoch konserviert sind. Es ist daher zu beachten, dass ein mit diesem Test erhaltenes positives Ergebnis auch das Ergebnis einer Infektion mit *Penicillium*, und nicht mit *Aspergillus*, sein könnte.

Die analytische Selektivität wurde mit DNA-Proben untersucht, die aus einer Fülle verschiedener Pilz- und Nicht-Pilz-Spezies extrahiert worden waren. Bei folgenden Spezies wurde kein positives Ergebnis erhalten:

Blastomyces capitatus, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Cladosporium* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Doratomyces microsporus*, *Fusarium solani*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhodotomila rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Scedosporium apiospermum*, *S. prolificans*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon capitatum*. Auch für die folgenden Bakterienspezies wurde kein positives Ergebnis erhalten: *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Lactobacillus plantarum*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*.

Humane DNA und die folgenden 3 Spezies, *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum* und *Alternaria alternata*, wurden auf dem SmartCycler®, jedoch nicht auf dem LightCycler® 2.0 System getestet. Alle vier Proben ergaben bei dem Assay negative Ergebnisse.

Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit und der Wiederholbarkeit analysierten vier verschiedene Laboranten ein Set bestehend aus sieben verschiedenen Template-DNAs (jeweils als Dreifach-Bestimmung); insgesamt wurden 168 Tests durchgeführt. Die Experimente wurden unter Verwendung einer Charge des MycAssay™ Aspergillus-Kits und zwei verschiedenen Thermocyclern an zwei unterschiedlichen Standorten im Vereinigten Königreich durchgeführt.

Die Ergebnisse wurden unter Berücksichtigung des Grenzwerts der Leerprobe (LoB) und des klinischen Cut-off-Werts (CCO) ausgewertet. Bei der sechsfachen Konzentration der Nachweisgrenze (LoD) stimmten die Ergebnisse bei 100 % der getesteten Proben hinsichtlich des LoB-Werts überein (positiv), und 87,5% der Proben stimmten hinsichtlich des CCO-Werts überein. Bei Konzentrationen über der sechsfachen Nachweisgrenze (6 x LoD) stimmten 100 % der Proben sowohl hinsichtlich des CCO- als auch des LoB-Werts überein.

Übertragbarkeit des klinischen Cut-off-Wertes

Der klinische Cut-off bei 36,0 wurde mit dem SmartCycler® Thermocycler ermittelt. Dieser Cut-off-Wert wurde unter Verwendung einer Template-DNA mit einer *Aspergillus*-Konzentration, die mit dem SmartCycler® nachweislich ≥95 % positive Ergebnisse beim CCO ergab, analytisch auf die LightCycler® 2.0 Plattform übertragen. Es wurde ein Cp-Wert von 37,0 bestimmt, der dann durch Amplifikation von Template-DNAs bei drei unterschiedlichen Konzentrationen bestätigt wurde.

Die folgenden Daten zur Leistungscharakteristik wurden unter Verwendung des Cepheid SmartCycler® Real-Time-PCR-Systems erhalten.

Interferierende Substanzen (Gegenanzeigen für die Anwendung)

Die folgenden Substanzen wurden in klinisch relevanten Konzentrationen getestet; für keine von ihnen wurde eine Inhibition des Assays festgestellt: Acetylcystein, Amphotericin, Beclometason-Dipropionat, Budesonid, Natrium-Colistimethat, Fluticasonpropionat, Formoterolfumarat-Dihydrat, Ipratropiumbromid, Lidocain, Mannitol, Salbutamolsulfat, Salmeterol, Natriumchlorid, Natrium-Cromoglicat, Terbutalin, Tobramycin.

Leistungsbewertung

Zur Leistungsbewertung des MycAssay™ Aspergillus-Kits wurden in zwei Kliniken Proben aus dem Respirationstrakt (BAL-Proben) entnommen. Aus diesen wurde dann unter Verwendung des MycXtra™ Pilz-DNA Extraktions-Kits die DNA extrahiert, die anschließend gelagert und dann im Assay analysiert wurde. Die Ergebnisse wurden sowohl mit der klinischen Diagnose als auch mit Kulturergebnissen verglichen.

Nach Auswertung eines Datenbestands, der anhand von Proben an verschiedenen Standorten und mit unterschiedlichen Patientenpopulationen gewonnen worden war, wurde der Cut-off bei einem Ct-Wert von 36,0 festgelegt. Verschiedene Cut-off-Werte wurden hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit, mit der zwischen einer Erkrankung und einem Zustand ohne Erkrankung differenziert werden kann, evaluiert.

PCR vs. klinische Diagnose

	klinisch positiv	klinisch negativ		
PCR positiv	31	1	0,97	PPW
PCR negativ	2	10	0,83	NPW
	0,94	0,91		
	Sensitivität	Spezifität		

PCR vs. Aspergillus-Kultur

	Kultur positiv	Kultur negativ		
PCR positiv	29	3	0,91	PPW
PCR negativ	2	10	0,83	NPW
	0,94	0,77		
	Sensitivität	Spezifität		

Von den analysierten Proben enthielten nach DNA-Extraktion mit dem MycXtra™ Kit 0,8 % PCR-Inhibitoren, wie anhand der Ergebnisse der IAC-Proben festgestellt wurde.

Klinische Befundung

Der MycAssay™ Aspergillus-Kit ist als diagnostisches Hilfsmittel vorgesehen. Die Ergebnisse müssen im Zusammenhang mit dem klinischen Zustand des Patienten und den Ergebnissen weiterer diagnostischer Tests bewertet werden.

Nachfolgend werden Empfehlungen für Befundungen angegeben, wobei jede einzelne von der Interpretation der Assay-Ergebnisse abhängt.

Ergebnis-Ziffer „1“

„Aspergillus spp. nicht nachgewiesen.“

Ergebnis-Ziffer „2“

„Aspergillus spp. nachgewiesen. Positives Ergebnis. Mit diesem Assay wird auch *Penicillium* spp. nachgewiesen.“

Ergebnis-Ziffer „3“

„Test fehlgeschlagen. Anwesenheit von Inhibitoren oder anderen unbekannten Substanzen.“

Grenzen des Verfahrens

Die Grenzen des Verfahrens hängen in erster Linie von der Qualität der Primärprobe ab:

- Ist sehr wenig Probenmaterial vorhanden oder stammt die Probe nicht aus dem betroffenen Lungenbereich, so wird der Test weniger sensitiv und kann falsch negative Werte liefern.
 - BAL-Proben sollten vor der DNA-Extraktion aus dem Pellet zentrifugiert werden.
 - Die Daten zeigten auch, dass durch eine Volumenreduktion des für die DNA-Extraktion verwendeten Überstands – wobei die Volumenreduktion durch den Zentrifugationsschritt erreicht wurde – die Menge an Inhibitoren, die in das Assay-System eingeschleppt werden, reduziert wird.
-
- Falsch-positive Ergebnisse sind möglich, wenn es sich beim infizierenden Erreger um *Penicillium* spp. handelt, der mit diesem Kit nicht von *Aspergillus* spp. differenziert werden kann.
 - Obwohl das MycXtra™ Pilz-DNA-Extraktionsverfahren so entwickelt wurde, dass PCR-Inhibitoren entfernt werden, sind nicht alle Medikamente oder Patientenpopulationen daraufhin evaluiert worden.
 - Das Verfahren ist weder umfassend mit Sputum-Proben noch mit induzierter Kochsalzlösung oder mit Proben von Kindern evaluiert worden.
 - Von außen eingetragene Kontaminationen der Originalprobe oder der Kit-Reagenzien können zu falsch-positiven Testergebnissen führen. Derartige Kontaminationen können durch mit *Aspergillus* verunreinigte Luft, unsaubere experimentelle Arbeitstechnik beim Umgang mit der Positivkontrolle oder durch eine äußerliche Kontamination (insbesondere von Pipettierhilfen) mit *Aspergillus*-DNA verursacht werden.
 - Da ein richtig-positives Ergebnis bei Proben von Patienten, die vorübergehend oder dauerhaft mit *Aspergillus* spp. kolonisiert sind, erhalten werden kann, ist bei der Interpretation der Testergebnisse eine klinische Beurteilung im Zusammenhang mit der Erkrankung notwendig.

LIZENZIERUNG

TopTaq™ Hot Start wird von QIAGEN bezogen. QIAGEN® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland).

Dieses Produkt wird unter der Lizenz des Public Health Research Institute, Newark, New Jersey, USA, verkauft und darf gemäß den PHRI-Patentrechten nur für die humane *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.

SmartCycler® ist ein eingetragenes Warenzeichen von Cepheid (904 Caribbean Drive, Sunnyvale, CA, 94089, USA).

Dieses Produkt ist zum Teil durch eine exklusiv gewährte Lizenz einer Patentanmeldung des Fred Hutchinson Cancer Centers in Seattle (USA) abgedeckt.

LightCycler® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Roche Diagnostics GmbH.

IVD



Lab21, 184 Cambridge Science Park,
Cambridge CB4 0GA, United Kingdom.
Telephone: +44 (0) 1638 552 882
Facsimile: +44 (0) 1638 552 375
Email: productsupport@lab21.com

